

Bioenergetics of calcification in mytilid bivalves along the Baltic Sea salinity gradient

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel



Vorgelegt von
Trystan Sanders
Kiel 2018



Bioenergetics of calcification in mytilid bivalves along the Baltic Sea salinity gradient

Bioenergetik der Kalzifizierung in Mytiliden Muscheln entlang des Salinitätsgradienten der Ostsee

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

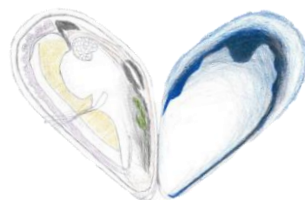
Dr. rer. nat.

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-
Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von

Trystan Sanders

Kiel, 2018



Referee: PD Dr. Frank Melzner
Co-referee: Prof. Martin Wahl

Date of the oral examination: 26 June 2018
Approved for publication:

Signed:

Summary

The Baltic Sea is a semi-enclosed, brackish water body with a decreasing salinity gradient from almost fully marine in the west, to below 3 practical salinity units (psu) in the northern and eastern basins. Marine calcifying mussels in the genus *Mytilus* have extensively colonised the coastal Baltic benthos down to salinities of 4.5 psu and play a key role as ecosystem engineers and nutrient recyclers. Despite this, growth rates are severely reduced below salinities of ~ 11 psu with maximum shell lengths reaching only half that of fully marine populations. This has been attributed to increased metabolic costs associated with osmotic stress, however, along this salinity gradient, $[Ca^{2+}]$ and dissolved inorganic carbon (C_T) availability also decrease, theoretically hindering calcification. It is not fully understood how low salinity impacts calcification and whether reduced ability to biomineralize $CaCO_3$ structures ultimately limits growth of mytilid mussels at low salinity.

In the first and second chapters of this thesis, the environmental gradients of the south-western Baltic Sea were utilised to investigate how environmental salinity impacts calcification in Baltic *Mytilus*. A series of laboratory experiments were conducted in chapter one to investigate which factor (salinity, $[Ca^{2+}]$ or C_T) is primarily responsible for impeding calcification rates of Baltic *Mytilus* at low salinities. Juvenile mussels were exposed to a range of salinities (6 – 16 psu), Ca^{2+} concentrations (0.5 – 4 mmol kg⁻¹) and HCO_3^- (a proxy for C_T availability) concentrations (300 – 2100 μmol kg⁻¹) to identify at which level these factors begin to limit calcification. Results reveal that $[Ca^{2+}]$ is the chief factor limiting calcification in juvenile Baltic mytilids with calcification rates reduced below 4 mmol kg⁻¹ corresponding to ~ 11 psu. Laboratory experiments and field monitoring of juvenile growth rates, salinity and carbonate chemistry at three sites along the Baltic salinity gradient reveal that C_T availability probably does not limit calcification in Baltic *Mytilus* and high coastal total alkalinity (A_T) may buffer potential impacts of ocean acidification. Field monitoring data also revealed that slow growth at an 11 psu site is accompanied by low food availability, suggesting $[Ca^{2+}]$ alone cannot sufficiently explain field growth rate patterns between sites and other factors (e.g. environmental variability, food availability, biotic interactions) are important in influencing Baltic *Mytilus* calcification rates.

Chapter two further investigated how low calcification rates potentially limit growth in Baltic mussels by estimating the energetic cost of calcification at three salinities (6, 11 and 16 psu) and two temperatures (8 and 18 °C) in juvenile Baltic *Mytilus*. Whole animal energy budgets

were calculated for mussels over three feeding regimes, used to induce a wide range of calcification rates. Energy available for calcification was plotted against calcification rate to estimate the costs of calcification for the first time in non-larval bivalves. Results revealed that a considerable proportion of available growth energy (29 – 58 %) is allocated to calcification, signifying it is a major energy consuming process in Baltic *Mytilus*. Findings also indicate that costs of calcification are ~ 2-3-fold higher at low salinity and temperatures suggesting growth of Baltic *Mytilus* below ~ 11 psu is severely impeded by high costs of biomineralisation.

Baltic *Mytilus* are all hybrids of *M. edulis*-like genotypes and *M. trossulus*-like genotypes with higher frequencies of *M. edulis*-like alleles at high salinities and higher *M. trossulus*-like allele frequencies at low salinities. The steepest cline in allele frequencies coincides with the steepest section of the salinity gradient, implying salinity plays a role in shaping the genetic structure of Baltic *Mytilus*. This suggests physiological differences between Baltic *Mytilus* populations along the Baltic salinity gradient may result from either acclimation or local adaptation to habitat salinity regimes. However, it has not yet been empirically tested whether genetic differences between hybrid populations result from salinity driven selection and whether local adaptation to low salinity is facilitated by higher frequencies of *M. trossulus* alleles. To test this, two larval experiments were conducted on three Baltic *Mytilus* populations. The first experiment compared the salinity tolerance of a *M. edulis*-like (16 psu) and *M. trossulus*-like (7 psu) population, by quantifying growth, mortality and settlement success at high (16 psu) and low (7 psu) salinity. The second experiment investigated natural selection by low salinity for *M. trossulus* alleles by utilising a highly genetically admixed population of Baltic *Mytilus* (similar frequencies of both *M. edulis*-like and *M. trossulus*-like alleles) from the centre of the genetic transition zone (11 psu). Results from these experiments indicate that low salinity selects against *M. edulis*-like alleles, increasing frequencies of *M. trossulus*-like alleles compared to simulated selection predictions. This natural selection was complimented by evidence of local adaptation to low salinity in *M. trossulus*-like genotypes, due to better larval survival and settlement success at 7 psu compared to *M. edulis*-like genotypes. These findings highlight salinity as a strong selective force shaping the genetic structure of Baltic *Mytilus* populations and driving local adaptation in Baltic *Mytilus* populations.

In marine osmoconforming invertebrates, salinity tolerance is determined by an organisms' ability to adjust the concentrations of its intracellular organic osmolyte and inorganic ion pools. It therefore seems likely, that better salinity tolerance and local adaptation of low salinity *M. trossulus* populations results from adaptive changes in osmolyte pools. However, this has not

yet been demonstrated experimentally. Consequently, the salinity tolerance and impacts of salinity on intracellular osmolyte pools were investigated in two salinity adapted populations of Baltic *Mytilus* to investigate if local adaptation is facilitated by qualitative and/or quantitative adjustments of intracellular osmolyte pools. A 16 psu population (Kiel) and a 7 psu population (Usedom) were exposed to salinities between 16 and 4.5 psu and their organic and inorganic osmolyte pools were investigated using metabolomic profiling (^1H -NMR spectroscopy) and flame photometry. Metabolomic profiles revealed that the low salinity population exhibits lower concentrations of total organic osmolytes mostly due to significantly lower taurine content. Compared to the high salinity population, the low salinity population also exhibited higher intracellular cation concentrations across all salinities. These findings were complemented by lower mortality rates in low salinity *M. trossulus* populations, suggesting that increased intracellular cation concentrations may be an adaptive response in facilitating local adaptation to extremely low salinities. This is potentially a means to reduce the detrimental impacts of low intracellular ion concentrations on cellular biochemical processes and these findings provide first insights into the mechanisms of adaptation to low salinities in marine bivalves.

In conclusion, it appears that slow growth rates in Baltic mytilid mussels results from limited availability of Ca^{2+} coupled with high costs of calcification. Findings from laboratory experiments reveal these constraints on calcification only become significant below 11 psu, however field monitoring suggests other environmental factors such as food availability and salinity/carbonate chemistry variability are likely important factors governing calcification in Baltic *Mytilus*. It has also emerged that low salinity populations of *M. trossulus*-like genotypes exhibit local adaptation to extremely low salinities, likely facilitated in part by adaptive changes in intracellular osmolyte pools. These findings provide a vital contribution to our understanding of how environmental salinity can drive physiological adaptation as well as genetic segregation in an ecologically and economically important species complex. Climate and hydrological models predict rapid warming and desalination of the Baltic Sea over the next 80 years potentially leading to severe shifts in Baltic mytilid distributions. Therefore, understanding the mechanisms behind potential ecological changes enable us to make better predictions on how climate change might influence coastal ecosystems. Future work should aim to dig deeper into understanding the cellular mechanisms behind changes in growth rates and osmolyte pools with salinity, to broaden our knowledge regarding the processes of adaptation to a rapidly changing ocean.

Zusammenfassung

Die Ostsee ist ein Binnenmeer mit einem starken Salinitätsgradienten, von nahezu marinen Bedingungen im Westen, bis zu Salinitäten unter 3 psu im Nordosten. Marine, kalzifizierende Muscheln der Gattung *Mytilus* sind ein großer Bestandteil des Benthos und tolerieren Salzgehalte bis hinunter zu 4,5 psu. Sie sind eine Schlüsselart in küstennahen Ökosystemen und maßgeblich an der Nährstoffumsetzung beteiligt. Allerdings sind die Wachstumsraten der Muschelschalen bei Salinitäten unter 11 psu halb so schnell wie die von vollständig marinen Populationen. Dies wurde seit jeher auf höhere Stoffwechselkosten bei geringerem Salzgehalt zurückgeführt, die mit osmotischem Stress assoziiert sind. Jedoch sinkt mit dem Salzgehalt auch die Verfügbarkeit von $[Ca^{2+}]$ und gelöstem inorganischen Kohlenstoff (C_T), was ebenso die Kalzifizierung beeinflussen kann. Bisher ist ungeklärt, wie genau niedrige Salinitäten Kalzifizierung beeinflussen, und ob eine verringerte Fähigkeit $CaCO_3$ zu biomineralisieren, das Wachstum von mytiloiden Muscheln bei niedrigen Salzgehalten letztlich limitiert.

Im ersten und zweiten Kapitel dieser Dissertation wird beschrieben, wie der natürliche Umweltgradient der südwestlichen Ostsee genutzt wurde, um zu untersuchen, wie der Salzgehalt die Kalzifizierung von Baltischen *Mytilus* beeinflusst. In Kapitel Eins wird anhand von Laborexperimenten erläutert, welcher Faktor (Salinität, $[Ca^{2+}]$ oder C_T) primär für die geringeren Kalzifizierungsraten von Baltischen *Mytilus* bei niedrigen Salinitäten verantwortlich ist. Dazu wurden juvenile Muscheln einer Reihe von Salzgehalten (6 – 16 psu), $[Ca^{2+}]$ -Konzentrationen (0.5 – 4 mmol kg⁻¹) und $[HCO_3^-]$ -Konzentrationen (als Indikator für C_T Verfügbarkeit; 300 – 2100 μmol kg⁻¹) ausgesetzt, um einen Schwellenwert für Kalzifizierung zu ermitteln. Die Ergebnisse weisen auf $[Ca^{2+}]$ als entscheidenden Faktor bei der Kalzifizierung juveniler Miesmuscheln in der Ostsee hin. Dies äußert sich durch verringerte Kalzifizierungsraten ab 4 mmol kg⁻¹, welches einer Salinität von ca. 11 psu entspricht. Laborversuche und regelmäßige Feldmessungen von Wachstumsraten juveniler Muscheln, Salinität und Karbonatchemie an drei Standorten entlang des Salinitätsgradienten der Ostsee ergaben, dass die natürliche C_T Verfügbarkeit wahrscheinlich keine Auswirkung auf den Kalzifizierungsprozess von Miesmuscheln in der Ostsee hat. Zudem könnte eine hohe Gesamtalkalinität (A_T) im Küstenbereich potentielle Effekte der Ozeanversauerung dämpfen. Feldmessungen zeigen, dass langsames Wachstum bei 11 psu auch mit niedriger Nahrungsverfügbarkeit einhergehen. Dies deutet daraufhin, dass $[Ca^{2+}]$ alleine *in situ* Wachstumsraten und Unterschiede zwischen Standorten mit unterschiedlichen Salzgehalten

nicht ausreichend erklärt, und auch andere Parameter (wie z.B. Variabilität der Umweltbedingungen, Nahrungsverfügbarkeit, biotische Interaktionen) einen wichtigen Einfluss auf die Kalzifizierungsraten von Baltischen *Mytilus* haben.

In Kapitel Zwei wird untersucht, wie niedrige Kalzifizierungsraten das Wachstum von Baltischen *Mytilus* limitieren können. Dazu wurden die energetischen Kosten des Kalzifizierungsprozesses bei verschiedenen Salzgehalten (6, 11 und 16 psu) und zwei Temperaturen (8 und 18°C) in juvenilen Miesmuscheln ermittelt. Drei verschiedene Fütterungsprotokolle wurden eingesetzt, um die Bandbreite der Kalzifizierungsraten weiter zu erhöhen, und die Energiebilanz der Muscheln als Ganzes zu berechnen. Ein beträchtlicher Anteil der verfügbaren Energie (29 – 58 %) ist für Kalzifizierung verfügbar. Dies unterstreicht, dass Kalzifizierung einen maßgeblichen Teil der Energie in Baltischen *Mytilus* verbraucht. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Kosten der Kalzifizierung bei niedrigen Salinitäten und Temperaturen ca. 2-3-fach höher sind. Das Wachstum bei Muscheln unter einer Salinität von 11 psu ist damit durch die hohen Kosten der Biomineralisation ernsthaft eingeschränkt.

Die Baltischen *Mytilus* sind Hybriden aus *M. edulis*-ähnlichen und *M. trossulus*-ähnlichen Genotypen. Hierbei sind die *M. edulis*-ähnlichen Allele häufiger bei hohen Salinitäten zu finden, wohingegen *M. trossulus*-ähnliche Allele vermehrt bei niedrigen Salinitäten vorkommen. Dabei fällt die extremste Änderung in den Allelfrequenzen mit dem steilsten Abschnitt des Salzgehaltsgradienten zusammen, was darauf hindeutet, dass der Salzgehalt eine Rolle in der genetischen Struktur von *Mytilus* in der Ostsee spielt. Physiologische Unterschiede zwischen den verschiedenen *Mytilus* Populationen entlang des Salzgradienten kommen daher entweder durch Akklimatisierung oder durch lokale Anpassung an die Salinität zustande. Es ist jedoch noch nicht empirisch getestet worden, ob genetische Unterschiede zwischen Hybridpopulationen aus der salinitätsgetriebenen Selektion resultieren und ob die lokale Anpassung an einen niedrigen Salzgehalt durch Häufung von *M. trossulus*-ähnlichen Allelen erleichtert wird. Um dies zu überprüfen, wurden zwei Larvenversuche an drei Baltischen *Mytilus* Populationen durchgeführt. Im ersten Experiment wurde die Salinitätstoleranz einer *M. edulis*-ähnlichen (16 psu) und einer *M. trossulus*-ähnlichen (7 psu) Population durch Quantifizierung von Wachstum, Mortalität und Fortpflanzungserfolg bei hohem (16 psu) und niedrigem (7 psu) Salzgehalt verglichen. Im zweiten Experiment wurde die natürliche Selektion durch einen geringen Salzgehalt auf *M. trossulus*-ähnliche Allele untersucht. Dazu wurde eine genetisch gemischte Baltische *Mytilus* Population (gleiche Häufigkeiten von *M. edulis*-ähnlichen und *M. trossulus*-ähnlichen Allelen) aus der Mitte der genetischen

Übergangszone (11 psu) gewählt. Die Ergebnisse beider Experimente zeigen, dass ein geringer Salzgehalt gegen *M. edulis*-ähnliche Allele selektiert, wodurch die Häufigkeiten von *M. trossulus*-ähnlichen Allelen im Vergleich zu simulierten Selektionsprognosen erhöht werden. Diese natürliche Selektion zeigt sich auch in einer lokalen Anpassung von *M. trossulus*-ähnlichen Genotypen an einen niedrigen Salzgehalt, wie z.B. höhere Überlebensraten der Larven und erfolgreiches Ansiedeln bei 7 psu im Vergleich zu *M. edulis*-ähnlichen Genotypen. Die Ergebnisse betonen den Salzgehalt als eine starke selektive Kraft, die die genetische Struktur der Baltischen *Mytilus* Populationen beeinflusst und zu einer lokalen Anpassung führt.

Bei marinen Osmokonformern wird die Salinitätstoleranz durch die Fähigkeit eines Organismus definiert, die Konzentrationen der intrazellulären organischen Osmolyte und der anorganischen Ionen anpassen zu können. Möglicherweise resultiert eine bessere Toleranz gegenüber niedrigem Salzgehalt von *M. trossulus*-ähnlichen Populationen aus Anpassungen der Osmolyte. Dies konnte jedoch bisher noch nicht nachgewiesen werden. In diesem Experiment wurden die Auswirkungen des Salzgehaltes auf die lokale, qualitative und/oder quantitative Anpassung des intrazellulären Osmolytpools in zwei salinitätsadaptierten Baltischen *Mytilus* Populationen untersucht. Eine Kieler Population (16 psu) und eine Population aus Usedom (7 psu) wurden Salinitäten zwischen 16 und 4,5 psu ausgesetzt und ihre organischen und anorganischen Osmolyte mittels Metabolom-Profilings (¹H-NMR-Spektroskopie) und Flammenphotometrie untersucht. Metabolomische Profile zeigen, dass die niedrig saline Population insgesamt niedrigere Konzentrationen von organischen Osmolyten aufweist, hauptsächlich aufgrund eines signifikant niedrigeren Tauringehaltes. Verglichen mit der Population aus 16 psu, weist die niedrig saline Population zudem höhere intrazelluläre Kationenkonzentrationen in allen Salzgehalten auf, möglicherweise um die schädlichen Auswirkungen niedriger intrazellulärer Ionenkonzentrationen auf biochemische Prozesse zu reduzieren. Zusammen mit niedrigeren Mortalitätsraten in *M. trossulus* Populationen aus Usedom deutet dies darauf hin, dass erhöhte intrazelluläre Kationenkonzentrationen eine adaptive Antwort zur lokalen Anpassung an extrem niedrige Salzgehalte sein können. Diese Ergebnisse liefern erste Einblicke in die Mechanismen der Anpassung an niedrige Salzgehalte in marinen Bivalvia.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass langsame Wachstumsraten in Baltischen *Mytilus* auf eine begrenzte Verfügbarkeit von [Ca²⁺] bei gleichzeitig hohen Kalzifizierungskosten zurückzuführen sind. Ergebnisse von Laborexperimenten zeigen, dass diese Einschränkungen während des Kalzifizierungsprozesses erst unterhalb einer Salinität von 11 psu signifikant

werden. Jedoch deutet das Feldmonitoring darauf hin, dass andere Umweltfaktoren, wie die Verfügbarkeit von Nahrung und Salinitäts- bzw. Karbonatchemieschwankungen, wahrscheinlich wichtige Faktoren für die Kalzifizierung bei Baltischen *Mytilus* sind. Außerdem hat sich gezeigt, dass Populationen von *M. trossulus*-ähnlichen Genotypen eine lokale Anpassung an extrem niedrige Salinitäten zeigen, was wahrscheinlich teilweise durch adaptive Veränderungen in intrazellulären Osmolytpools erreicht wird. Diese Ergebnisse liefern einen wichtigen Beitrag zu unserem Verständnis, wie der Salzgehalt die physiologische Anpassung sowie die genetische Segregation in einem ökologisch und ökonomisch wichtigen Artenkomplex vorantreiben kann. Klimatische und hydrologische Modelle sagen eine rasche Erwärmung und Entsalzung der Ostsee in den nächsten 80 Jahren voraus, was möglicherweise zu einer starken Verschiebung der Verbreitung von Baltischen *Mytilus* führen könnte. Wenn wir die Mechanismen hinter den potenziellen ökologischen Veränderungen verstehen, können wir bessere Vorhersagen treffen, wie der Klimawandel die Küstenökosysteme beeinflussen könnte. Zukünftige Arbeiten sollten darauf abzielen, die zellulären Mechanismen hinter den Veränderungen der Wachstumsraten und Osmolyte mit dem Salzgehalt genauer zu verstehen, um unser Wissen über die Anpassungsprozesse an einen sich schnell verändernden Ozean zu erweitern.